

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：82675

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19395

研究課題名（和文）心筋細胞を起点とする多細胞・多臓器連関解析法の確立

研究課題名（英文）Establishment of multi-cell / multi-organ linkage analysis method using cardiomyocytes

研究代表者

西田 基宏（Nishida, Motohiro）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（機構直轄研究施設）・生命創成探究センター・教授

研究者番号：90342641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：MetRSL274G発現マウスを用いた細胞種特異的タンパク質標識法を用いて多臓器・多細胞間コミュニケーションを解析する実験系を構築し、心臓病態モデルマウスにおいて心筋由来のミトコンドリア関連タンパク質が腎臓に輸送されることを見出した。ミトコンドリアの品質低下が心筋細胞からのミトコンドリア放出を促進するという過去の報告に基づいて、心筋ミトコンドリア品質の制御機構について解析を行い、超硫黄分子がミトコンドリア品質の保護に働くことを明らかにした。また、超硫黄分子によるミトコンドリア関連タンパク質の超硫黄化が心疾患モデルマウスの心臓で大きく変化することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の臓器や組織は個々に機能するだけでなく、様々な臓器・組織との相互作用を介して生体の高次機能を維持している。心臓移植後の患者で報告されている「心臓の記憶」もまた臓器連関を示唆する例であるが、心臓が多臓器に与える情報については不明であった。病気の心臓がミトコンドリア関連タンパク質を腎臓などに輸送することを初めて明らかにした点は心臓原生の臓器連関の仕組みを読み解く糸口になるとともに、ミトコンドリアの品質維持を標的とする疾患診断マーカーや予防・治療法の開発につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We established an experimental system to analyze multi-organ and multicellular communication using a cell-type-specific protein labeling method in MetRSL274G-expressing mice. Using a cardiac disease model in mice, we discovered that mitochondria-related proteins originating from the myocardium are transported to the kidneys. Based on previous reports suggesting that the decline in mitochondrial quality promotes the release of mitochondria from cardiomyocytes, we investigated the regulatory mechanisms of mitochondrial quality in cardiomyocytes. We also revealed that persulfide molecules play a role in protecting mitochondrial quality. Furthermore, the persulfidation of mitochondria-related proteins is significantly altered in the hearts of cardiac disease model mice.

研究分野：生理学

キーワード：臓器連関 心臓 ミトコンドリア 超硫黄化 恒常性維持

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において、個々の細胞はお互いにコミュニケーションを取り合うことで自律的な細胞社会を構築している。近年、様々な多臓器連関が明らかにされ、心血管機能調節においても体系的に仕組みを理解していく重要性が示されている。心臓は血液循環を介して様々な臓器とつながっており、その機能不全は他臓器の機能障害へと直結する。従来、心臓は、ポンプ器官としてのみの位置づけであったが、心不全の代償機構としてナトリウム利尿ペプチド (ANP) を分泌することが明らかとなり、内分泌器官としての役割にも注目が集まっている。また、当研究グループでも、心筋細胞のレドックスシグナル研究を通じて、(1) 心筋細胞特異的に硫黄ストレスを増加させると腎機能障害が誘導される、(2) 酸化ストレス依存的に心筋細胞から分泌されるタンパク質によって心線維芽細胞死が誘導される、などの ANP では説明がつかない心筋細胞を起点とした多細胞・多臓器連関を示唆する知見を見出している。

サイトカインやケモカインといった特定のタンパク質因子群が多細胞・多臓器間の情報伝達を担うことは広く知られているが、近年では計測技術の発展やエクソソームなどに代表される細胞外小胞を介した新たな分泌系の発見により従来の分泌タンパク質以外にも様々な分子 (タンパク質、脂質、核酸など) さらにミトコンドリアなどのオルガネラまでもが多細胞間で輸送されることが明らかになっている。

ミトコンドリアはエネルギー産生を担う主要な細胞小器官であり、永続的な収縮応答に大量のエネルギーを必要とする心筋細胞において、ミトコンドリアの機能異常は心筋の機能不全に直結する。いくつかのマウスモデル実験において、心不全モデルマウス的心筋細胞から障害を受けたミトコンドリアが細胞外小胞を介して線維芽細胞などに輸送されることが報告されており、心筋ミトコンドリアの品質制御は多臓器・多細胞間のコミュニケーションに重要であると考えられる。ミトコンドリアの品質を制御する要因としてこれまで活性酸素などの酸化ストレスを中心としたレドックス応答の関与が明らかにされてきた。その一方で、近年、レドックス研究において、超硫黄分子と総称される化学反応性の高い硫黄代謝物が生体内に豊富に存在することが明らかとなり、これら超硫黄分子が心臓を始めとする様々な臓器の生体応答を制御することが示唆されている。当研究グループでは、超硫黄分子が心筋ミトコンドリアの品質管理に重要であることを見出してきた。

2. 研究の目的

(1) 組織特異的タンパク質標識法を用いた心筋由来分泌タンパク質の同定

多細胞間のコミュニケーションを理解する上で、「シグナル分子がどこから分泌され、どこに伝わるのか」その情報伝達の足取りを把握することは重要であるが、個体解析においてシグナル分子の伝搬を正確にとらえることは困難である。近年、メチオニンアナログを特異的に取り込むことができるメチオニル tRNA 合成酵素変異体 (MetRS^{L274G}) が報告された。そこで、心筋細胞で MetRS^{L274G} を発現するマウスを作製し、心筋細胞で合成されるタンパク質を特異的にメチオニンアナログで標識する。そして、血中や他臓器における心筋細胞由来タンパク質を同定することで心筋細胞を起点とした多細胞・多臓器連関を解析するための実験系を構築する。

(2) 超硫黄分子を介した心筋ミトコンドリア品質制御機構の解明

心筋特異的タンパク質標識法を用いて、心不全モデルマウスの腎臓から心筋由来のミトコンドリア関連タンパク質群が見つかったことから、細胞外小胞を介したミトコンドリア伝搬が心筋を起点とした多臓器連関に関与することが示唆された。そこでミトコンドリア伝搬の引き金となるミトコンドリア品質制御機構について、超硫黄分子と総称される硫黄原子が複数個連なったカテナン構造を持つ硫黄代謝物 (R-S(S)_nH) の観点から検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 心筋特異的 MetRS^{L274G} 発現マウスを用いた心筋細胞由来タンパク質の標識

CRE 特異的に MetRS^{L274G} を発現するマウス (C57BL/6-Gt(ROSA)26Sortm1(CAG-GFP-Mars*^{L274G})Esm/J、ジャクソンラボラトリーから購入) と心筋細胞特異的にタモキシフェン誘導型 CRE リコンビナーゼを発現するマウス (A1cfTg(Myh6-cre/Esr1*)1Jmk/J、ジャクソンラボラトリーから購入) を掛け合わせることで、心筋特異的に MetRS^{L274G} を発現するマウスを作製した。10 mg/ml タモキシフェン (コーン油) を 40 mg/kg/day で 5 日間マウス腹腔内に投与することで CRE リコンビナーゼの発現を誘導した。メチオニンアナログ Azidonorleucine (ANL) を投与する 2 日前からメチオニン含量を 0.1% に減量した飼料に交換し、その後、25 mg/ml ANL を 0.1 g/kg で 24 時間間隔で 7 回、もしくは 12 時間間隔で 4 回腹腔内に投与した。

アジド基を持つ ANL を Click chemistry を用いて標識する。組織抽出液 (2 mg/ml) に click chemistry mixture (1 mM CuSO₄, 100 μM TBTA, 1 mM TCEP, 40 μM Alexa647-alkyne もしくは biotin-

alkyne)を加え 60 分反応させる。メタノールクロロホルム沈殿で未反応のプロープを除去した後、に再溶解した。Alexa647 標識タンパク質は In-gel fluorescence 法で検出し、Biotin 標識タンパク質は Streptavidin-beads を用いて精製した。精製した Biotin 標識タンパク質を SDS-PAGE および銀染色によって検出し、検出したバンドから質量分析を用いてタンパク質を同定した。

(2) 超硫黄分子が心筋ミトコンドリア品質に及ぼす影響についての解析

ラット新生児 (2 日齢) から単離した新生児ラット由来心筋細胞 (NRCM) を低酸素チャンパー (1% O₂) で 18 時間培養することで心筋ミトコンドリアに障害を与えた。ミトコンドリア機能は、ミトコンドリア膜電位および ATP 産生能から評価した。ミトコンドリア膜電位は JC-1 プロープを用いて Red/Green 比から、ATP 産生能はミトコンドリア局在型 ATP センサープロープ (Mito-ATeam) の FRET 比から測定した。低酸素培養時に超硫黄分子ドナーを添加することで低酸素ストレスによるミトコンドリア障害がどのように変化するかについて検討を行った。

(3) タンパク質超硫黄化検出

タンパク質システイン側鎖の硫黄カテナーションであるタンパク質超硫黄化を biotin switch 法で検出する実験系を構築した。超硫黄鎖の安定化に寄与するチロシン存在下でシステイン SH 基もしくは超硫黄鎖 SSH 基を Iodoacetyl-biotin で標識し、Biotin 化タンパク質をレジンに濃縮し、還元剤を用いて SSH 基を選択的に切断することで超硫黄化タンパク質を精製した。野生型マウスと心筋梗塞モデルマウスの心臓から超硫黄化タンパク質を精製し、質量分析を用いて心筋梗塞後の心臓で変化する超硫黄化タンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) 心筋由来タンパク質標識の条件検討

心筋細胞で合成されるタンパク質のメチオニンを ANL に置換するために、心筋細胞特異的に MetRS^{L274G} を発現させたマウスに ANL を投与する条件の検討を行った。まず、ANL の MetRSL^{274G} 変異体への特異性を評価するために、C57BL6J 野生型と心筋特異的 MetRSL^{274G} 発現マウスをメチオンin減量食で 2 日間飼育した後、ANL を 0.1 g/kg で 24 時間間隔で 7 回腹腔内に投与した。その後、心臓を摘出し、click chemistry を用いて ANL を Alexa647 で標識した。その結果、心筋細胞特異的に MetRS^{L274G} を発現させたマウスでのみ Alexa647 のシグナルが確認されたことから ANL は非常に高い特異性で MetRS^{L274G} に取り込まれることが確認できた (図 1A)。次に ANL の投与条件として、24 時間間隔で 7 回と 12 時間間隔で 4 回の腹腔内投与で比較を行ったところ、両者間で ANL 取り込み率に大きな違いは見られなかった (図 1B)。

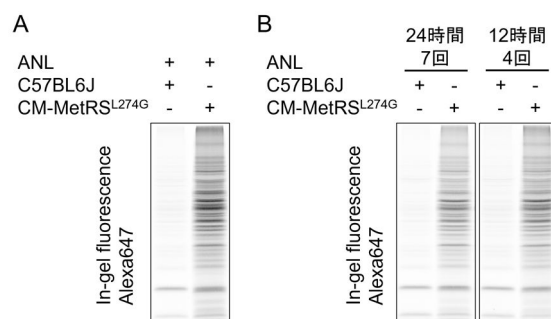


図 1. 心筋由来タンパク質標識の条件検討
A) 野生型マウス (C57BL6J) と心筋特異的 MetRS^{L274G} 発現マウス (CM-MetRS^{L274G}) に ANL を投与した。心臓サンプルを用いて取り込まれた ANL を Alexa647 で標識した。B) ANL 投与条件の比較

(2) 他臓器における心筋由来タンパク質の検出

上記の ANL 投与条件を基に、ANL 投与マウスから腎臓および肝臓を摘出して心筋由来タンパク質を同定する実験を行った。Alexa647 で標識した ANL タンパク質の結果を図 2 に示す。MetRS^{L274G} 発現マウスから摘出した腎臓では、MetRS^{L274G} 非発現マウスの腎臓と比較して Alexa647 標識タンパク質の量が増加した。一方、肝臓においては MetRS^{L274G} 発現マウスで増加するバンドを確認することができなかった (図 2)。そこで次に、腎臓サンプルを用いて、ANL を Biotin 標識し、Streptavidin-beads で ANL 標識タンパク質を精製した。野生型マウスと心筋梗塞モデルマウスから摘出した腎臓サンプルを用いて心筋由来タンパク質の比較解析を行った。心筋梗塞モデルマウスの腎臓では心筋由来タンパク質の量が増加しており、これらのタンパク質を質量分析を用いて解析したところ、ミトコンドリアに関連するタンパク質が多数同定された。以上の結果から、心不全時には心筋細胞から細胞外小胞を介してミトコンドリアが腎臓に運ばれることが示唆された。

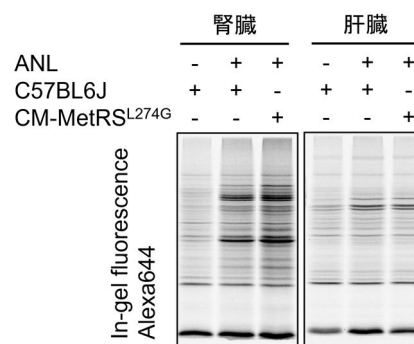


図 2. 腎臓、肝臓における心筋由来タンパク質の検出
心筋特異的 MetRS^{L274G} 発現マウスに ANL に投与した。腎臓と肝臓サンプルを用いて取り込まれた ANL を Alexa647 で標識した。

(3) 低酸素ストレスによる心筋ミトコンドリア品質の低下と超硫黄分子による保護効果

これまでにミトコンドリアの機能低下に伴い心筋細胞からミトコンドリアが放出されることが報告されていることから、心不全時における心筋ミトコンドリア品質の低下がミトコンドリアを介した心 - 腎連関の引き金になると予想された。そこで、心不全時の心筋ミトコンドリア品質を制御する系として超硫黄分子に着目した。当研究グループではこれまでに心筋梗塞後初期に起こる心筋ミトコンドリアの品質異常（過剰分裂）が心機能低下の引き金になることを見出している。そこでNRCMに心筋虚血の *in vitro* モデルである低酸素ストレスを与え心筋ミトコンドリアの機能を低下させた際に超硫黄分子を細胞に導入することでミトコンドリア機能がどのように変化するのかについて検討を行った。その結果、低酸素ストレスによるミトコンドリア膜電位の低下および ATP 産生能の低下は超硫黄分子の導入により改善することが明らかとなった（図 3）。一方、心筋細胞での超硫黄産生酵素である CARS2 を siRNA を用いて発現抑制すると、低酸素によるミトコンドリア膜電位の低下が増悪化することが明らかとなった。この結果から、超硫黄分子は心筋ミトコンドリア品質の保護に重要であることが示唆された。

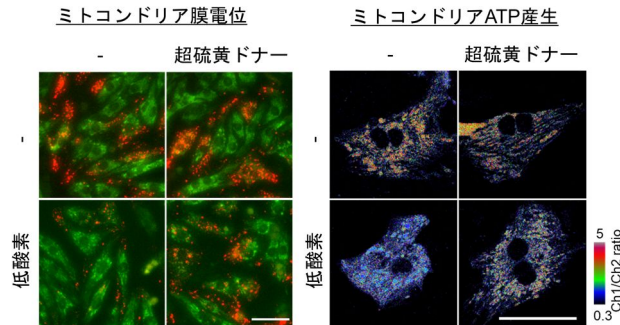


図 3. 超硫黄分子による心筋ミトコンドリア機能の改善
NRCM を超硫黄分子ドナー存在下および非存在下で低酸素培養し、ミトコンドリア膜電位を JC-1 の赤 / 緑比、ミトコンドリア ATP 産生能を mito-ATeam の FRET 比を用いてそれぞれ評価した。

(4) 心不全時に変動する超硫黄化タンパク質の解析

超硫黄分子の構造的特徴である硫黄カテナーションはタンパク質のシステイン側鎖でも確認され、このタンパク質超硫黄化はタンパク質の機能を制御する翻訳後修飾の 1 つと考えられている。上記の実験で得られた超硫黄分子による心筋ミトコンドリア保護機構の分子メカニズムについて、タンパク質超硫黄化の観点から検証を行った。そこで、超硫黄化タンパク質を精製する実験系の構築を行った。チオール SH 基と超硫黄鎖-SSH 基を共に Biotin 化し、精製後、還元剤を用いて-SS-Biotin を切断することにより超硫黄化タンパク質を精製する。超硫黄構造を安定化したまま末端を Biotin 化するためのアルキル化剤、バッファー、添加剤などの条件の検討を行い、図 4A に示すように超硫黄ドナーを添加した NRCM で超硫黄化タンパク質が増加する条件が得られた。次に、心筋梗塞モデルマウスとコントロールマウスの心臓からそれぞれ超硫黄化タンパク質を精製し、質量分析を用いて比較解析を行ったところ、多くのミトコンドリア関連タンパク質の超硫黄化が心疾患によって変動することが明らかとなった（図 4B）。

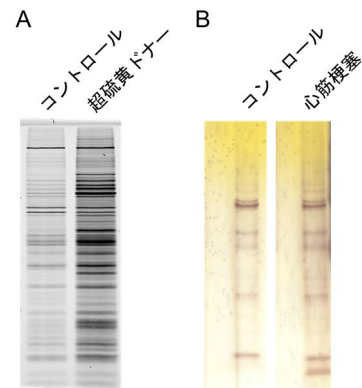


図 4. 超硫黄化タンパク質の検出
A) 超硫黄ドナーを添加した NRCM と添加していない NRCM から超硫黄化タンパク質を検出した。B) コントロールマウスと心筋梗塞処置マウスの心臓において超硫黄化タンパク質を比較した。

(5) まとめと今後の課題

MetRS^{L274G} 発現マウスを用いた細胞種特異的タンパク質標識法を用いて多臓器・多細胞間コミュニケーションを解析する実験系を構築し、心臓病態モデルマウスにおいて心筋由来のミトコンドリア関連タンパク質が腎臓に輸送されることを見出した。ミトコンドリアの品質低下が心筋細胞からのミトコンドリア放出を促進するという過去の報告に基づいて、心筋ミトコンドリア品質の制御機構について解析を行い、超硫黄分子がミトコンドリア品質の保護に働くことを明らかにした。また、超硫黄分子によるミトコンドリア関連タンパク質の超硫黄化が心疾患モデルマウスの心臓で大きく変化することも明らかにした。今後の課題として、ミトコンドリア関連タンパク質の超硫黄化の変化がミトコンドリアの品質制御に及ぼす影響について検討を行う。そして、超硫黄化を介したミトコンドリア品質の制御が、ミトコンドリアを介した心 - 腎連関に及ぼす影響について検討を行う。さらにミトコンドリアを介した心 - 腎連関が腎機能や生体の恒常性に与える影響についても検討を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamada Shigeru, Noda Takamasa, Okabe Kaori, Yanagida Shota, Nishida Motohiro, Kanda Yasunari	4. 巻 149
2. 論文標題 SARS-CoV-2 induces barrier damage and inflammatory responses in the human iPSC-derived intestinal epithelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 139 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpsh.2022.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura Akiyuki, Tanaka Tomohiro, Kato Yuri, Nishiyama Kazuhiro, Nishida Motohiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Cardiac robustness regulated by reactive sulfur species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.21-84	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishiyama Kazuhiro, Ariyoshi Kohei, Nishimura Akiyuki, Kato Yuri, Mi Xinya, Kurose Hitoshi, Kim Sang Geon, Nishida Motohiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Knockout of Purinergic P2Y6 Receptor Fails to Improve Liver Injury and Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3800 ~ 3800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tang Xiaokang, Nishimura Akiyuki, Ariyoshi Kohei, Nishiyama Kazuhiro, Kato Yuri, Vasileva Elena A., Mishchenko Natalia P., Fedoreyev Sergey A., Stonik Valentin A., Kim Hyoung-Kyu, Han Jin, Kanda Yasunari, Umezawa Keitaro, Urano Yasuteru, Akaike Takaaki, Nishida Motohiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Echinochrome Prevents Sulfide Catabolism-Associated Chronic Heart Failure after Myocardial Infarction in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 52 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md21010052	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yuri, Nishiyama Kazuhiro, Man Lee Jae, Ibuki Yuko, Imai Yumiko, Noda Takamasa, Kamiya Noriho, Kusakabe Takahiro, Kanda Yasunari, Nishida Motohiro	4. 巻 24
2. 論文標題 TRPC3-Nox2 Protein Complex Formation Increases the Risk of SARS-CoV-2 Spike Protein-Induced Cardiomyocyte Dysfunction through ACE2 Upregulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 102 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24010102	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oda Sayaka, Nishiyama Kazuhiro, Nishida Motohiro, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Myocardial TRPC6-mediated Zn ²⁺ influx induces beneficial positive inotropy through adrenoceptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6374-6374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34194-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama Masahiro, Unoki Takamitsu, Aoki Hanako, Nishimura Akiyuki, Shinkai Yasuhiro, Warabi Eiji, Nishiyama Kazuhiro, Furumoto Yuka, Anzai Naohiko, Akaike Takaaki, Nishida Motohiro, Kumagai Yoshito	4. 巻 57
2. 論文標題 Cystine-dependent antiporters buffer against excess intracellular reactive sulfur species-induced stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 102514 ~ 102514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2022.102514	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Numaga Tomita Takuro, Shimauchi Tsukasa, Kato Yuri, Nishiyama Kazuhiro, Nishimura Akiyuki, Sakata Kosuke, Inada Hiroyuki, Kita Satomi, Iwamoto Takahiro, Nabekura Junichi, Birnbaumer Lutz, Mori Yasuo, Nishida Motohiro	4. 巻 180
2. 論文標題 Inhibition of transient receptor potential cation channel 6 promotes capillary arterIALIZATION during post ischaemic blood flow recovery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 94 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bph.15942	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimauchi Tsukasa, Numaga-Tomita Takuro, Kato Yuri, Morimoto Hiroyuki, Sakata Kosuke, Matsukane Ryosuke, Nishimura Akiyuki, Nishiyama Kazuhiro, Shibuta Atsushi, Horiuchi Yutoku, Kurose Hitoshi, Kim Sang Geon, Urano Yasuteru, Ohshima Takashi, Nishida Motohiro	4. 巻 11
2. 論文標題 A TRPC3/6 Channel Inhibitor Promotes Arteriogenesis after Hind-Limb Ischemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2041 ~ 2041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11132041	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://physiology.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html http://www.nips.ac.jp/circulation/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------